

価系として、各ロットの間葉系細胞のペレットカルチャーを行う（図 6）

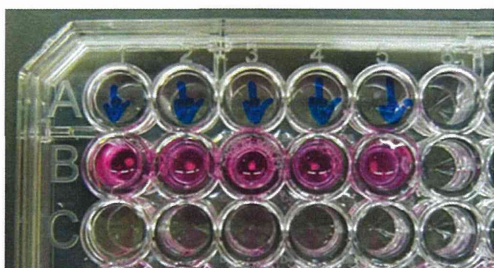


図 6: ペレットカルチャー

C. 研究結果

i) 液性因子のプロファイリング

5 種類の異なるロットのヒト骨髄間葉系細胞から RNA を抽出し、またコントロールとしてヒト皮膚線維芽細胞からも RNA を抽出し、マイクロアレイ(東レ 3D-Gene)を行った。

例えば、軟骨との関連因子では間葉系細胞において TGF β の発現が高く、BMP2 はむしろ低いなどの特徴があり、BMP などはロット間のバラツキが非常に大きかった。マイクロ RNA の発現についても TaqMan[®] Array MicroRNA Cards を用いて発現解析を行った。例えば、軟骨分化に関連した miR-140 は間葉系細胞において発現が高く、ロット間で著明な発現のバラツキを認めた。

ii) 分化・増殖の in vitro 評価

軟骨分化の評価として、5 種類の異なるロットのヒト骨髄間葉系細胞を用いてペレットカルチャーを行った。形成されたペレットのサイズにロット間での差は認められなかったが、サフラニン O 染色での染色性には差を認め、3 ロットで良好に染色されたのに対して、残りの 2 ロットでは染色性が低かった。

D. 考察

間葉系細胞の液性因子プロファイリングに関しては、mRNA およびマイクロ RNA のアレイを終了し、線維芽細胞をコントロールとすることで、間葉系細胞に特徴的に高発現している因子やその因子のロット間のバラツキについて確認できた。今後はこれらのデータとペレットカルチャーやヌードラット膝関節軟骨欠損モデルへの移植実験の結果との対比によって、必要な因子を選別していく予定である。間葉系細胞の軟骨分化の in vitro 評価系としてペレットカルチャーを行い、ロット間でサフラニン O 染色での染色性にバラツキを認めた。今後は細胞外基質の含有について定量評価する予定である。また、他のパラメーターとの対比による意味づけも行って行く予定である。

E. 結論

間葉系細胞由来の液性因子のプロファイリングや軟骨分化・増殖能の in vitro 評価系を用いたデータを収集した。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費（再生医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

間葉系細胞の液成因子プロファイリングによる品質評価基準の策定

担当責任者 株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング
研究開発部長 菅原 桂 研究員 柳田 忍

研究要旨

本研究で使用する、ヒト間葉系細胞の特性を明らかにし、品質評価基準を策定することを目的に、担当機関においては、複数ロットのヒト間葉系細胞を培養して、その培養上清に含まれるサイトカイン及び増殖因子を ELISA にて定量評価する。本年度は、5 ロットのヒト骨髄由来間葉系細胞を培養し、それらが分泌するサイトカイン及び増殖因子を定量する系を確立し、ロットや培養条件に応じてそのプロファイルが異なることを確認した。また、ヒト骨髄由来間葉系細胞のコロニー形成能及び軟骨への分化能を測定する系を確立し、細胞自体の品質評価基準としての活用を検討した。

A. 研究目的

ヒト骨髄間葉系細胞（以下 MSC）5 ロットを用いて、ELISA によるサイトカイン・増殖因子など液性因子の発現プロファイリングを行う。その結果について、広島大学で実施する、ヌードラットの関節軟骨欠損モデルへの移植による軟骨修復効果についてロット間での比較を行い、液性因子の発現パターンと軟骨修復効果の関連について解析し、軟骨修復に関与する液性因子の同定と品質評価基準の策定を行う。

また、培養条件（磁性化の有無や継代数の違い）により、液性因子の産生にどのような変化が見られるかを調べ、MSC の品質評価としての活用を検討する。

さらに、本技術の将来的な産業化も見据えて簡易的な分析法バリデーションを実施し、品質評価方法としての妥当性を確認する。

また、これまでに広島大学における磁性化 MSC の移植後の体内動態の実験結果から、磁場による誘導で MSC が欠損部に効率よく生着し、軟骨に分化して欠損を修復する修復メカニズムが示唆されている。そのため、上記の液性因子の分泌能の評価に加え、コロニー形成能（以下 CFE）及び軟

骨への分化能を解析する系を確立し、MSC の品質評価としての活用を検討する。

B. 研究方法

まず初めに MSC（ロンザ社、PT-2501、広島大で検討中の細胞と同一ロットを含む）を培養した。購入したバイアルを解凍後、3500~5000 個/cm² でフラスコに播種し、15%の FBS を含む DMEM で培養した。培地交換は4日に1度以上の頻度で実施した。70~90%コンフルエントまで培養した後、トリプシンで細胞を剥離して継代を行った。増殖した細胞を凍結する際には、10% DMSO を添加した培地に細胞を懸濁し、緩慢凍結により凍結した。

ELISA 用の測定サンプルの調製については、50~70%コンフルエントに達した際、培地交換を実施し、その 48 時間後に培地を測定用サンプルとして回収し、-30℃で凍結保存した。その際、フラスコ内の細胞数も計数し、細胞 1 万個あたりが分泌する濃度として定量した。

磁性体を取り込ませた MSC の培地を測定する場合は、およそ 70%コンフルエントまで細胞を培養し、リゾビスト注®（富士フィルム RI ファーマ）を培地に添加し（鉄

として 49 µg/mL)、一晩インキュベートして
て貪食によりリゾビストを取り込ませた。

ELISA の測定には、R&D systems 社の
Quantikine® シ リ ー ズ 及 び Life
Technologies 社の Novex®シリーズのキット
を使用した。検体は、検量線作成用の標
準物質希釈溶液で適当な倍率で希釈し、各
検体について duplicate で測定した。また、
各因子の測定の際、コントロールとして培
養に使用していない培地を同時に測定し、
その測定値を検体の測定値から差し引いた
値を MSC からの分泌量とした。

CFE 測定に関しては、フラスコに 1500
個の細胞を播種し、14 日間培養を行った。
4%パラホルムアルデヒドで固定した後、
1%クリスタルバイオレットで染色した。1
ヶ所で 50 個以上に分裂している細胞集団
を 1 つのコロニーとしてカウントした。

軟骨への分化誘導はペレット培養により
行った。25×10⁴ 個の細胞を 15mL チュー
ブに入れ、遠心してペレットを形成させた
後、BMP-6、TGF-β3 等を含有する軟骨分
化誘導培地で 3 週間培養した。評価はパラ
フィン切片を作製し、トルイジンブルー染
色を実施してメタクロマジーを確認した。

C. 研究結果

MSC の培養上清に含まれるサイトカイン・
増殖因子を ELISA で測定し、MSC から
分泌される因子として以下の因子を認め
た。

SDF-1、TGF-β1、TGF-β2、FGF-2、TIMP-1、
TIMP-2、TIMP-4、IL-6、IL-8、HGF、
VEGF、pro-MMP-1、MMP-13

また、以下の因子は検出不可能または微
量には含まれるが定量性に問題がある因子
であった。

BMP-7、RANTES、MMP-8、TNF-α、IFN-γ、
TGF-α、MMP-9、IL-1α、IL-1β、IL-2、
PDGF-AA、PDGF-BB、IGF-1

次に、簡易的な分析法バリデーションと

して、1 ロットで下記因子の定量の際の変
動係数を算出し、併行精度を確認した。細
胞の播種から分岐させ、n=3 で実施した。

IL-6 : 9.3%

TIMP-2 : 4.5%

IL-6やTIMP-2の測定においては良好な
精度を認めた。

次に、磁性化の有無や継代数の違い
(early passage : P4、late passage : 1.5
ヶ月の追加培養)により液性因子のプロフ
ァイルにどのような変化が見られるかを調
べた。特徴的な変化を認めた例について以
下に示す。

IL-6 : すべてのロットで IL-6 の分泌を認
めた。early passage では 5 ロットの平均
が 471 pg/10⁴ 個であるのに比べ、late
passage では 1560 pg/10⁴ 個であり、顕著
に増加していた。

MMP-13 : early passage では 5 ロット中
すべてのロットで定量下限以下の値だっ
たが、late passage では 2 ロットに
MMP-13 の分泌を認めた。

HGF : 5 ロット中 3 ロットでは early
passage、late passage 共に定量下限値以
下だった。1 ロットで early passage、late
passage 共に検出、別の 1 ロットでは
early passage のみで検出された。

磁性化の有無による変化については、多
少の変動はあるものの、大きく値が変化す
ることはなかった。

次に、MSC の細胞自体の評価として
CFE を確認した。5 ロットの MSC におい
てコロニー形成率は 8.3%、1.1%、1.1%、
0.7%、0.2%であった。また、磁性化した
MSC については、15.5%、7.4%、4.5%、

4.5%、0.2%であった。磁性化した MSC で CFE が高くなる傾向が見られた。

最後に、軟骨への分化能を解析した。5ロット中2ロットでペレット培養において軟骨への分化能を確認した（他の3ロットに関しては現在解析中）。

D. 考察

今回、ロットや継代数に応じて MSC の液性因子分泌のプロファイルが変化することを示した。例えば、IL-6 は late passage では分泌が増える傾向があった。IL-6 はリウマチ等で炎症を惹起する因子として知られている。これを多く分泌する MSC は移植後の軟骨修復に影響を与える可能性があり、品質管理項目として採用する必要があるかもしれない。液性因子分泌のプロファイルの差が実際にどのように軟骨修復に関与するのかについて、今後、広島大学で実施する動物実験の結果と併せて明らかにしていく予定である。

今回、簡易的な分析法バリデーションとして ELISA の併行精度を確認した。各種液性因子は pg/mL という小さな濃度で定量されたが、変動係数 10%以下という良好な精度で測定でき、品質管理方法として有用であることが示唆された。

また、今回、移植後に MSC が欠損部に生着して軟骨を修復するメカニズムを想定し、CFE 及び軟骨への分化能の確認を行った。今回の評価方法は培養に数週間必要であるなど、高コストであることが将来的な産業化においては短所となり得る。今後、これらのパラメータと相関する遺伝子発現の解析など、より簡便で有効な評価方法の開発が必要であろう。

E. 結論

本研究においては、MSC の品質評価の指標として MSC が分泌するサイトカイン・増殖因子、CFE、軟骨への分化能を測定する系を確立した。また、ロットや培養条件によってこれらのプロファイルが異な

ることを見出し、これらが MSC の品質管理項目として活用できることを示した。サイトカイン・増殖因子の定量に関しては併行精度を確認し、その分析法としての妥当性を示した。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III. 学会等発表実績

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「自己骨髄間葉系細胞の磁気ターゲティングによる関節軟骨欠損修復」
機関名 国立大学法人広島大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Biological Reconstruction of the Knee Joint (口頭)	Mitsuo Ochi	奈良 (APKASS 2014)	2014. 4. 14	国内
膝関節の生物学的再建術 2014 (口頭)	越智光夫	札幌 (整形外科Expertセミナー学術講演会)	2014. 4. 19	国内
Cutting edge technique for cartilage repair (口頭)	Mitsuo Ochi	China (International Forum of Orthopaedics Sports Medicine &)	2014. 5. 8	国外
Biological reconstruction of the knee (口頭)	Mitsuo Ochi	Italy (Sacred Heart Catholic University)	2014. 5. 12	国外
Cartilage repair using magnet (口頭)	Mitsuo Ochi	Netherlands (ESSKA CONGRESS)	2014. 5. 14	国外
関節軟骨局所欠損から変形性関節症に対する治療法 (口頭)	越智光夫	神戸 (第87回日本整形外科学会学術総会)	2014. 5. 23	国内
膝関節再建術 -基礎から臨床へ- (口頭)	越智光夫	松山 (第138回愛媛整形外科集談会)	2014. 6. 7	国内
Cartilage Repair; Past, Present, and Future (口頭)	Mitsuo Ochi	Indonesia (ConMed Linvatec Asia Arthroscopy Symposium)	2014. 6. 28	国外
Cartilage repair: past, present and future: lessons learned (口頭)	Mitsuo Ochi	Turkey (TUSYAD Congress)	2014. 9. 24	国外
軟骨欠損治療に関する世界の情勢 (口頭)	越智光夫	鹿児島 (第29回日本整形外科学会基礎学術集会)	2014. 10. 9	国内
Basic researches on cell transplantation and microRNA (口頭)	Mitsuo Ochi	Italy (Translational Research in Orthopedics and Traumatology)	2014. 11. 15	国外
Cartilage repair using magnets (口頭)	Mitsuo Ochi	Luxembourg (SFA Annual Congress 2014)	2014. 12. 3	国外
Cutting edge techniques of cartilage repair (口頭)	Mitsuo Ochi	Korea (Asian Cartilage Repair Society 2nd annual congress 2014)	2014. 12. 7	国外
自家骨髄間葉系幹細胞を用いた関節軟骨再生 (口頭)	亀井直輔、越智光夫	横浜 (第14回日本再生医療学会総会)	2015. 3. 19	国内

